动物学研究 2003, Oct. 24 (5): 362~366
Zoological Research
CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853

福建南北泥蚶种内分化的 RAPD 分析

李成华[1,2,3], 李太武[1,4], 宋林生[2], 苏秀榕[1]
(1. 宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211; 2. 中国科学院海洋研究所 实验海洋生物学开放研究室, 山东 青岛 266071; 3. 中国科学院研究生院 北京 100039)

摘要: 采用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术, 对泥蚶在福建以南 (广东汕头和湛江) 和福建以北 (浙江温岭和韩国) 种群 (分别合称南方类群和北方类群) 做了遗传分化研究。由筛选出的 20 个随机引物共获得 103 个清晰可辨的 RAPD 标记, 扩增片段长度在 250~2 500 bp。汕头种群与湛江种群, 韩国种群与温岭种群之间的最小遗传距离分别为 0.0612 和 0.0692, 而南、北类群间的遗传距离却在 0.3261~0.4511。类群间近交系数也大于类群内。NJ 和 UPGMA 法构建的系统树均显示汕头种群、湛江种群首先聚在一起, 再与温岭种群和韩国种群聚合, 说明两个类群发生了较明显的遗传分化, 估计与地理隔离有关。

关键词: 泥蚶; RAPD; 温岭种群; 韩国种群; 汕头种群; 湛江种群; 亲缘关系
中图分类号: Q754; Q959.215 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-5853(2003)05-0362-05

RAPD Analysis on Intra-species Differentiation of *Tegillarca granosa* Populations to the South and North of Fujian Province

LI Cheng-hua[1,2,3], LI Tai-wu[1,4], SONG Lin-sheng[2], SU Xiu-rong[1]
(1. *Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo* 315211, *China*;
2. *Experimental Marine Biology Laboratory, Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao* 266071, *China*;
3. *Graduate School, the Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100039, *China*)

Abstract: The random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was applied to analyze intra-species differentiation among *Tegillarca granosa* populations distributed to the south and north of Fujian province. Samples were collected from the south (Shantou and Zhanjiang in Guangdong province) and the north (Wenling in Zhejiang province, and Korea), and defined as the representatives of the southern populations (SP), and northern populations (NP), respectively. Amplified with 20 random primers, we acquired 103 distinguished RAPD loci, ranging from 250 bp to 2 500 bp in size. The least genetic distance between SP and NP was 0.3261-0.4511, while that within the populations of NP or SP was only 0.0612-0.0692. The inbreeding coefficient (*Fst*) between SP and NP was also larger than that within SP and NP. Using NJ and UPGMA methods, we also found the nearest phylogenetic relationship consistently occurred within the populations of the SP or NP. A significant intra-species genetic differentiation has occurred between SP and NP, probably due to the geographical isolation between the populations.

Key words: *Tegillarca granosa*; RAPD; Wenling population; Korea population; Shantou population; Zhanjiang population; Phylogenetic relationship

泥蚶(*Tegillarca granosa* Linnaeus)是浙江省重要的海水养殖贝类,经济意义十分巨大(Wu et al, 2001)。人们在泥蚶养殖和育苗的生产实践中发现,福建以北(包括福建)泥蚶和福建以南的广东地区沿海泥蚶存在差异:在形态上,后者壳前端较尖,壳厚度较薄,外形比较扁平,不膨胀;前者壳的颜色略带

收稿日期: 2003-06-05; 接受日期: 2003-09-09
基金项目: 浙江省科技厅重点项目 (001103207)
4. 通讯作者 (Corresponding author), Tel: 0574-87600738, E-mail: litaiwu@hotmail.com

黄色，而后者则相对较淡。在血量和血色上，后者血量少，血色淡。此外，后者一般性成熟早。Zhang et al(2002)对广西北海、浙江乐清湾和山东乳山湾的3个野生种群和2个养殖种群泥蚶肉的营养成分分析后发现，福建以北泥蚶与福建以南泥蚶在多种营养成分的含量上也存在较大差异。据此，仍将两者视为同一个种的不同地理种群是否恰当，值得进一步分析和研究。Li et al(2003)对韩国釜山、山东荣成、浙江温岭、浙江奉化和福建福鼎5个地理种群的RAPD研究结果表明，福建以北泥蚶5个地理种群无明显分化，从一个侧面证实了福建以北的泥蚶可能为一个亚种的推测。本文在此基础上再利用RAPD技术研究了福建以南泥蚶的遗传结构，从分子水平评估了福建南北两个种群的遗传分化现状，为下一步泥蚶遗传育种工作中的新品种筛选、建立优良品系提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验所需样品分别取自浙江温岭、韩国釜山、广东湛江和汕头。每个种群的个体数量为 30 ~ 40 个。活体低温保存运回实验室，－70 ℃超低温冰箱保存备用。

DNA 提取所用三羟甲基氨基甲烷（Tris）、十二烷基硫酸钠（SDS）购自上海生工生物工程技术服务有限公司；PCR 反应试剂（不含随机引物）、蛋白酶 K 均购自大连 TAKARA 公司，其他试剂均为 AR 级，购自宁波奥博科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 对每个种群不分个体大小随意抽取 24 个个体，剪下闭壳肌组织约 100 mg 用于基因组 DNA 的提取。提取方法参照 Li et al (2003)。

1.2.2 随机引物 实验所用的 20 个随机引物是从上海生工生物工程技术服务有限公司合成的 100 个引物中筛选出来的，引物序列略。

1.2.3 PCR 反应 基因组 DNA 扩增在 PE9600 PCR 扩增仪上进行。25 μL 反应体系中含有 2.5 μL 10× buffer、0.2 μmol/L dNTPs、2.5 mmol/L $MgCl_2$、25 ng DNA、66 ng Primer 及 1 U Taqase。阴性对照以等体积的 ddH_2O 替代基因组 DNA，其他组成与上述反应体系相同。经过 94 ℃变性 5 min 后；94 ℃变性 1 min，37 ℃退火 1 min，72 ℃延伸 2 min，运行 40 个循环；最后在 72 ℃延伸 10 min。扩增产物用 1.3% 琼脂糖凝胶电泳分离，EB 染色（Jin & Li，1993），上海复日凝胶成像系统下观察、拍照。

1.2.4 数据处理 电泳后清晰可辨的扩增条带记录为“1”，相应位置无扩增带的则记为“0”，参照 Nei & Li（1979）的遗传距离公式计算，利用 PHYLIP3.5 的 GENDIST 程序，计算种群间的遗传相似性指数 $F = 2N_{XY}/(N_X + N_Y)$ 和遗传距离 $D = 1 - F$，其中 N_{XY} 代表 X，Y 两个个体共有的扩增带，N_X、N_Y 是 X 与 Y 个体各自所有的扩增带。

种群间的近交系数（Fst）和有效繁殖亲本数（Nem）根据 Wrights（1978）的公式 $Fst = \sigma^2 q/qp$ 计算，其中 p 和 q 为平均基因频率，$\sigma^2 q$ 为基因频率方差，$\sigma^2 q = \sum(qi - q)^2/n$。以纯合隐性个体（即对应某一扩增条带，不出现该扩增带的个体）频率的平方根来计算隐性等位基因 a 的基因频率 q，显性等位基因 A 的基因频率 $p = 1 - q$。

而 $Nem = (1/Fst - 1)/4$，Ne 表示参与种群繁殖的有效个体数，m 表示迁移率。

基于 NJ 和 UPGMA 方法，利用 PHYLIP3.5 软件的 NEIGHBOR 和 DRAWGRAW 应用程序对 4 个种群的遗传距离进行聚类分析并构建系统树。

2 结果与分析

2.1 泥蚶 4 种群的 RAPD 结果

由 20 个随机引物共获得 103 个清晰可辨的扩增片段，长度在 250 ~ 2 500 bp 之间。扩增结果显示：同一引物，福建以北的温岭种群与韩国种群的带型基本一致，主带完全一致；福建以南的湛江种群与汕头种群的带型也基本一致，主带完全一致；而福建南北两大类群间的带型不同（图 1）。同时获得了以福建为界、区分南北两大类群的多条特异性条带及 4 个种群共有的 3 条主带（表 1）。

2.2 泥蚶 4 种群间的遗传结构分析

泥蚶 4 种群间的遗传距离及遗传相似性指数见表 2，近交系数、有效繁殖亲本数统计结果见表 3。福建南北两类群间的遗传距离在 0.3261 ~ 0.4511 之间，是两类群内种群间遗传距离的 6 ~ 7 倍。近交系数（Fst）与有效繁殖亲本数（Nem）也均表现为类群间的分化程度远远大于类群内种群间的分化程度。

2.3 泥蚶 4 种群间的系统树

NJ 和 UPGMA 聚类分析结果见图 2。两种方法

构建的系统树比较接近，广东湛江种群和汕头种群总是首先聚在一起，表明两种群间有较近的亲缘关系。

3 讨 论

3.1 福建南北泥蚶的分化问题

根据：①遗传距离 > 0.15 的两个种群，不可能是同一物种的结论（Thorp，1982）；②两种群间的 *Nem* 值 < 1 表示种群间发生了显著分化，*Nem* 在 1 ~ 5 发生了重要分化，> 50 分化不明显（Wright，1978）；③种群间 *Fst* 在 0 ~ 0.05 间无遗传分化的理论（Wright，1978），结合我们的研究结果（表 1、2、3），可在分子水平上认定泥蚶福建南北两大类群已发生了重要的遗传分化。而以南或以北类群内种群间的分化则相对不明显，这又与 Li et al（2003）对福建以北 5 个种群的 RAPD 分析结果相吻合。但南北两类群究竟分化到什么程度，需要进一步研究，这也是我们下一步的方向。目前我们已经测定出上述 4 个种群的 ITS2（internal transcribed spacer 2）序列，以期能够验证上述推论，查清分化程度。

3.2 遗传分化产生的可能原因

广东湛江种群与汕头种群亲缘关系较近，浙江温岭与韩国种群亦然。究其原因可能是福建以北泥

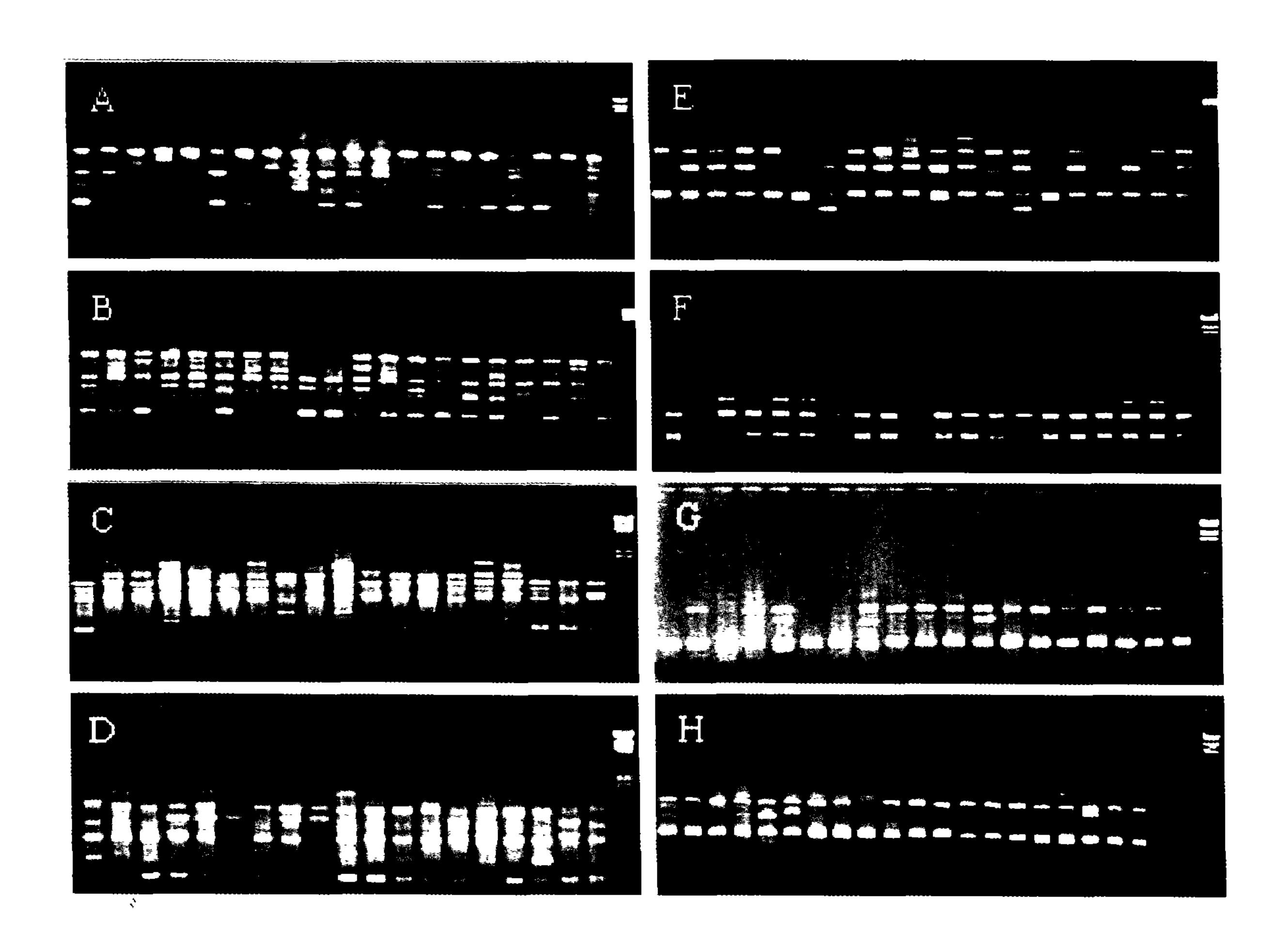


图 1 泥蚶 4 种群随机引物 S198（A、B、C、D）和 S197（E、F、G、H）的 RAPD 电泳图谱

Fig.1 Electrophoretogram of RAPD band patterns of 4 *Tegillarca granosa* populations, produced by the random primers S198（A, B, C, D）and S197（E, F, G, H）

A, E: 温岭种群（Wenling population）; B, F: 韩国种群（Korea population）; C, G: 湛江种群（Zhanjiang population）; D, H: 汕头种群（Shantou population）; M: λ – *Hin* dⅢ digest DNA Marker.

表 1　泥蚶 4 种群 RAPD 的特异标记

Table 1　Specificity marker of RAPD in 4 populations of *Tegillarca granosa*

引物编号 Primer number	特异性产物大小 Specific product length (bp)	共同享有的种群 Common shared population
S126	1 000	温岭和韩国
S198	1 700	温岭和韩国
S149	400	温岭和韩国
S151	2 800	湛江和汕头
S151	500	温岭和韩国
S152	2 000	温岭和韩国
S152	800	4 个种群
S154	1 950	湛江和汕头
S191	880，1 500	温岭和韩国
S192	540，1 400	温岭和韩国
S197	600	4 个种群
S197	900	温岭和韩国
S198	1 850	温岭和韩国
S198	300	湛江和汕头
S39	980	湛江和汕头
S39	300，600	温岭和韩国
S79	450	4 个种群

表 2　泥蚶 4 种群间的遗传距离（下）及遗传相似性指数（上）

Table 2　Genetic distance (below diagonal) and genetic identity (above diagonal) among 4 populations of *Tegillarca granosa*

	温岭种群 Wenling population	韩国种群 Korea population	湛江种群 Zhanjiang population	汕头种群 Shantou population
温岭种群 Wenling population	—	0.9388	0.6623	0.5489
韩国种群 Korea population	0.0612	—	0.6739	0.5864
湛江种群 Zhanjiang population	0.3377	0.3261	—	0.9308
汕头种群 Shantou population	0.4511	0.4136	0.0692	—

表 3　泥蚶 4 种群间的近交系数（下）及有效繁殖亲本数（上）

Table 3　Inbreeding coefficient (below diagonal) and available number for reproduction (above diagonal) among 4 populations of *Tegillarca granosa*

	温岭种群 Wenling population	韩国种群 Korea population	湛江种群 Zhanjiang population	汕头种群 Shantou population
温岭种群 Wenling population	—	6.3117	1.9567	2.2766
韩国种群 Korea population	0.0381	—	2.1333	2.6651
湛江种群 Zhanjiang population	0.1132	0.1049	—	6.3607
汕头种群 Shantou population	0.0989	0.0858	0.0378	—

蚶育苗的亲本基本上来自于福建以北地区（如韩国和山东地区）；而广东种群上述所有的生产活动也是在本地区或海南、广西等地完成，造成人为的地理隔离。其次，南海独特的地理位置和海底地形使其成为拥有最大的热带半封闭海域的边缘海，具有与其他海域不同的复杂多变的大洋环流（Fu，1994；Liu et al，1995）。在泥蚶的繁殖季节，由于南海环流的影响，幼体不能自由漂流到其他海域，同时其他海域的幼体也不能进入南海海域，这又形成天然的地理隔离。再者，受南海海域与北方海域气候条件的影响，南海海域泥蚶的繁殖季节在 4～5 月和 9～11 月，而北方海域则在 7～9 月（You et al，

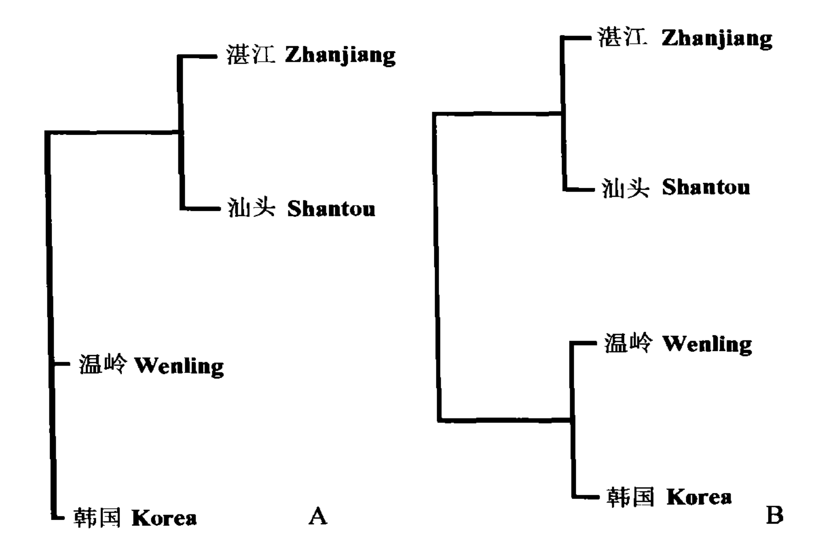


图 2 根据遗传距离用 NJ (A) 和 UPGMA (B) 法构建的泥蚶4种群间的系统树

Fig.2 Phylogenetic trees based on the genetic distance matrices with the methods of NJ (A) and UPGMA (B)

1999), 繁殖时间不重迭又产生了生殖季节的隔离。这三重隔离使得南北两类群丧失了必要的基因交流，产生了较大的遗传差异。

致谢：感谢浙江省科技厅提供的资助！在实验样品采集、鉴定和文章写作过程中得到了乐清水产局李琼文局长和浙江省海洋生物工程重点实验室的尤仲杰、徐善良和柏怀萍老师的帮助，在此谨向他们表示诚挚的谢意！

参考文献：

Fu G, Zhou FX, Yu SY, Wang DX. 1994. On the mechanism of SST low frequency oscillation of the south China sea [J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, **24** (4): 456-462. [傅 刚, 周发琇, 于慎余, 王东晓. 1994. 南海表层水温甚低频振荡的动力学机制. 青岛海洋大学学报, **24** (4): 456-462.]

Jin DY, Li MF. 1993. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. Beijing: Science Press. 304-316. [金冬雁, 黎孟枫. 1993. 分子克隆实验指导 [M]. 北京: 科学出版社. 304-316.]

Li TW, Li CH, Song LS, Su XR. 2003. RAPD variation within and among five populations of *Tegillarca granosa* [J]. *Biodiversity Science*, **11** (2): 118-124. [李太武, 李成华, 宋林生, 苏秀榕. 2003. 5个泥蚶种群遗传多样性的 RAPD 分析. 生物多样性, **11** (2): 118-124.]

Liu ZS, Zhao Y, Zhang YX. 1995. Study on geological survey in the south China sea and their direction [J]. *Marine Science*, **4**: 60-61. [刘昭署, 赵 岩, 张毅祥. 1995. 南海地质、地球物理调查研究及研究方向. 海洋科学, **4**: 60-61.]

Nei M, Li WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in term of restriction endonucleases [J]. *Process Natural Academic Science*, **76** (10): 5269-5273.

Thorp JP. 1982. The molecular dock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation, and systematics [J]. *Annual Review of Ecology Systematics*, **13** (1): 139-168.

Wrights. 1978. Evolution and the Genetics of Populations [M]. Chicago: University of Chicago Press.

Wu HX, Cai XL, Wu JB, Shen ZJ. 2001. A preliminary study on the karyotype of *Tegillarca granosa* (Linnaeus) in the Bay of Yueqing [J]. *Journal of Zhejiang Ocean University* (*Natural Science*), **20** (3): 189-192. [吴洪喜, 柴雪良, 吴建波, 沈志坚. 2001. 乐清湾泥蚶核型的初步研究. 浙江海洋学院学报 (自然科学版), **20** (3): 189-192.]

You ZJ, Wang YN, Yu RH. 1999. High-production Technology for Shellfish Culture [M]. Beijing: China Agriculture Press. 57-71. [尤仲杰, 王一农, 于瑞海. 1999. 贝类养殖高产技术. 北京: 中国农业出版社. 57-71.]

Zhang RP, Jia SJ, Ying XP. 2002. A comparative study on the nutritive composition and contents in the meat of *Tegillarca granosa* in varied populations [J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, **2**: 33-38. [张永普, 贾守菊, 应雪萍. 2002. 不同种群泥蚶肉营养成分的比较研究. 海洋湖沼通报, **2**: 33-38.]